사람 코점막 배세포에서 MUC5AC mRNA의 발현 양상

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 두뇌한국 21 의과학사업단[2]
강성석[1] · 김창훈[1] · 김현웅[1] · 이정권[1] · 윤주헌[1,2]

Expression of MUC5AC mRNA in the Goblet Cells of Human Nasal Mucosa

Seong Seok Kang, MD[1], Chang-Hoon Kim, MD[1], Hyun-Ung Kim, MD[1], Jeung-Gweon Lee, MD[1] and Joo-Heon Yoon, MD[1,2]

[1]Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery and [2]BK21 Project for Medical Sciences, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives：Mucus hypersecretion is a common feature in chronic sinusitis with polyps. Since mucus hypersecretion is commonly accompanied by goblet cell hyperplasia, it is important to identify which mucin gene mRNAs are expressed in the goblet cells of the surface epithelium in the human airway. This study aims to investigate the pattern of expression of MUC5AC mRNA in the goblet cells of human nasal mucosa. **Materials and Methods**：Six nasal polyps, five inferior turbinate mucosa specimens, and three normal-appearing mucosa specimens of the posterior ethmoid sinus were obtained. Each of the specimens were cut into 10 μm-thick serial frozen sections and *in situ* hybridization of MUC5AC mRNA was performed with an oligonucleotide probe. Alcian blue (pH 2.5)-periodic acid-Schiff staining was performed on the serial sections. **Results**：In human nasal polyps, MUC5AC mRNA was expressed in the cytoplasm of most of the goblet cells. However, in the inferior turbinate, MUC5AC mRNA was expressed in only some of the goblet cells. On the contrary, in the normal appearing mucosa of the posterior ethmoid sinus, MUC5AC mRNA was barely expressed in the goblet cells. Furthermore, MUC5AC mRNA was mainly expressed in some of the PAS-positive goblet cells. **Conclusion**：Only a portion of the goblet cells in the human nasal mucosa expressed MUC5AC mRNA. This result suggests that surface goblet cells might have other mucin genes in addition to MUC2 and MUC5AC. **(Korean J Otolaryngol 2001;44:388-91)**

KEY WORDS：MUC5AC mRNA · Goblet cell · Human nasal mucosa.

서 론

사람의 정상기도에서 점액의 양은 생성과 제거의 균형에 의해 조절되는데 이러한 균형이 무너질 때 점액과분비(hypersecretion) 등의 임상적인 증상이 일어나게 된다. 점액과분비는 비용이 동반된 만성 부비동염 환자에서 흔히 볼 수 있는 현상이다. 점액과분비는 주로 배세포(goblet cell)의 과다증식(hyperplasia)에 의해 일어나기 때문에, 사람 코점막의 배세포에서 어떤 점액유전자의 mRNA가 발현되는지 알아내는 것은 점액과분비를 이해하는데 중요하다.

논문접수일 : 2000년 11월 4일 / 심사완료일 : 2001년 1월 10일
교신저자 : 윤주헌, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361-8484 · 전송 : (02) 393-0580
E-mail : jhyoon@yumc.yonsei.ac.kr

점액 유전자는 현재까지 12개(MUC1-4, MUC5AC, MUC5B, MUC6-8, MUC9, MUC11, MUC12)가 발견되었으며,[1-4] 일반적으로 MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, 및 MUC8은 사람 정상 기도에서 분비되는 점액으로, MUC1, MUC3, 그리고 MUC4는 세포막에 붙어있는 점액으로알려져있다.최근에MUC9은사람난관에서, MUC11과 MUC12는 결장직장암에서 발견되었다.[3][4] 이 중 분비되는 점액의 유전자는 염증에서의 점액과분비를 연구하는데 중요하다. MUC5AC[3]와 MUC5B[4]는 점액 중에서도 양이 많아 주요점액으로 알려져 있고, MUC5AC와 MUC2 는 기도의 배세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다.[1][3-5]

Buisine 등[6]은 MUC5AC mRNAs는 기관과 기관지 점막의 모든 배세포에서 관찰된다고 보고하였다. 그러나 Kim 등[7]은 사람 코점막에서 PAS염색을 하여 많은 배세포의 존재를 확인하였지만, 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

으로 점액유전자를 분석한 결과 MUC5AC mRNA의 증가를 관찰할 수 없었다고 함으로써 코점막에 있는 모든 배세포에서 MUC5AC mRNA가 발현되지 않을 가능성을 암시하고 있다.

이에 저자들은 사람 코점막 배세포에서 MUC5AC mRNA의 발현양상을 alcian blue(AB, pH2.5) - periodic acid - Schiff(PAS) 염색과 MUC5AC *in situ* hybridization을 이용하여 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

조직표본채취

여섯 예의 비용조직은 천식, 아스피린 과민성, 그리고 낭성 섬유증(cystic fibrosis)의 기왕력이 없는 만성 부비동염 환자에서 채취하였고, 다섯 예의 정상 하비갑개 점막은 비중격교정술을 받은 환자에서 채취하였다. 또 만성 부비동염이 전사골동에 국한되었던 3예에서 수술시 정상적으로 보이는 후사골동의 점막을 채취하였다. 모든 대상은 채취 3개월 전부터 비내 약물요법, 경구용 스테로이드 및 항생제 치료를 받지 않았고, 모두 알레르기 피부검사에서 음성소견을 보였다.

MUC5AC mRNA in situ hybridization

표본은 수술방에서 채취 즉시, 만든지 7일 이내의 신선한 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 4℃로 최소 24시간 동안 고정하였다. 그 후 12% sucrose용액과 18% sucrose용액에각각액침(immersion)한후동결시켰다. 무균상태에서 10 μm 두께로 연속적인 동결절편을 만든 후 poly - L - lysine으로피막처리된슬라이드에도말하였다. MUC5AC 유전자의 oligonucleotide는 terminal transferase tailing reaction을 이용해서 dATP를 표지하였으며 tailing reaction은 37℃에서 15분간 시행하였다. MUC5AC를 위한 oligonucleotide probe는 이미 밝혀진 염기배열에 의해 만들었다(EMBL Accession number Z34277 : 5 'AGGGGC - AGAAGTTGTGCTGGTTGTGGGAGCAGAGGTTGTG CTGGTTGT '3).

조직절편은 4% 파라포름알데히드에서 30분간 고정하였고, 1 μg/ml DIG - labeled cRNA가 함유된 hybridization 완충액에서 56℃에서 처치하였다. 완충액은 50% formamide, 5×SSC, 그리고 40 μg/ml ssDNA로 이루어져 있다. 보합결합 후에 조직절편은 2×SSC과 0.1×SSC로 1시간 동안 세척하였다. 이 조직절편은 anti - DIG Fab 항체에서 2시간 동안 배양하였고, 표식자를 nitroblue tetrazolium chloride(NBT)와 5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolylphosphate(BCIP)를 이용하여 발색시켰다.

Alcian blue(AB ; pH 2.5) - periodic acid - schiff(PAS) 염색

연속된 절편을 슬라이드 위에 도말한 후 3% glacial acetic acid를 이용하여 3분간 처치하였다. 그 후 alcian blue(pH 2.5)(Muto chemicals, Japan)를 이용하여 40 분간 배양하였고 0.5% periodic acid(Fisher scientific, USA)용액을 이용하여 5분간 처치하였다. 그 절편을 Schiff 용액(Sigma Co., USA)으로 10분간 반응시켰고, 흐르는 물에 세척한 후 Harriss hematoxylin으로 배경염색 하였다.

결 과

만성 염증이 있었던 비용조직에서는 MUC5AC mRNA가 거의 모든 배세포의 세포질에서 발현되었다(Fig. 1). 그러나 비중격교정술을 받은 환자의 하비갑개에서는 MUC5AC mRNA가 배세포의 일부에서 발현되었다(Fig. 2). 염증이 없었던 후사골동의 정상 점막에서는 MUC5AC mRNA가 거의 발현되지 않았다(Fig. 3). MUC5AC mRNA는 주로 PAS 염색에 양성인 배세포의 일부에서 발현되었다. 이러한 결과는 모든 조직표본에서 비슷하게 나타났다.

고 찰

배세포는 점막하 선조직의 점액세포(mucous cell of submucosal gland)와 형태학적으로 같은 모양을 가지고 있으나, AB - PAS와 lectin 염색에 의해 서로 다르게 염색됨으로써, 기능이 다를 수 있다.[8)9)] 배세포는 세포질 내에 많은 분비과립을 가지고 있으며 점액을 분비하는데, 분비점액 유전자중에서 MUC2와 MUC5AC mRNA가 배세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다. 배세포에서 발현되는 점액 유전자의 조절은 다양한 호흡기질환 즉, 부비동염, 비염, 천식, 만성폐질환, 낭성 섬유증 등에서 나타나는 공통적인 특징인 점액과분비의 이해에 중요하다.

점액을 검사하는 전형적인 방법은 AB - PAS 조직화학적 염색방법으로 산성 당단백질과 중성 당단백질을 구별할 수 있다. AB로염색된당단백질은주로산성당단백질이고 PAS로 염색된 당단백질은 중성 당단백질이다. 또한 지금까지 많은 점액유전자가 발견되었지만, 중심단백질에 당질화가 심하게 되어 있는 점액의 구조적인 특성상 각각의 점액 단백질에 특이적인 항체를 만드는 것이 어렵기 때문에 점액 당단백질에

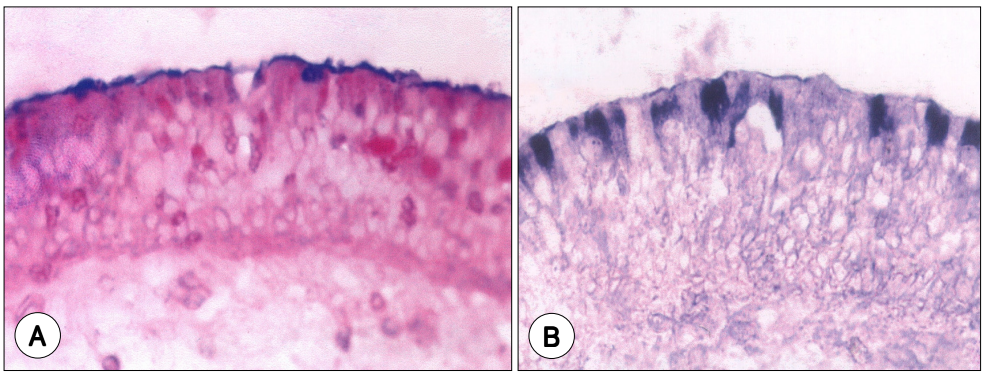

Fig. 1. Alcian blue-periodic acid-Schiff staining (A) and *in situ* hybridization of the MUC5AC mRNA (B) of the human nasal polyp. MUC5AC mRNA was expressed in the cytoplasm of most of PAS-positive goblet cells.

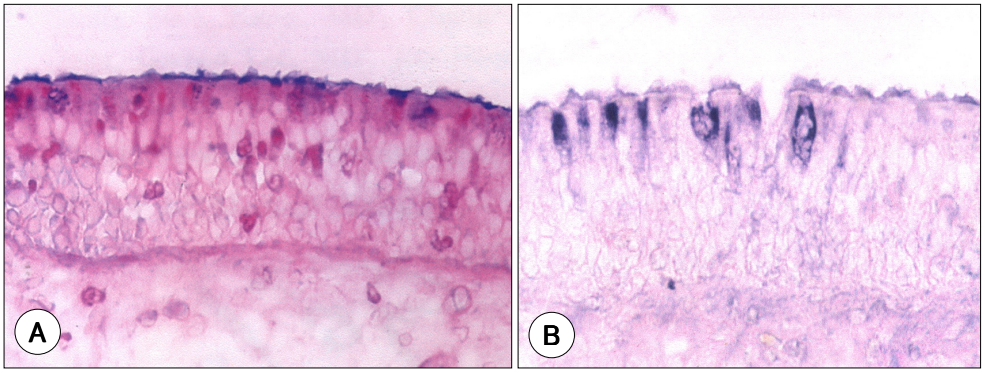

Fig. 2. Alcian blue-periodic acid-Schiff staining (A) and *in situ* hybridization of the MUC5AC mRNA (B) of the inferior turbinate mucosa. MUC5AC mRNA was expressed in only some of the PAS-positive goblet cells.

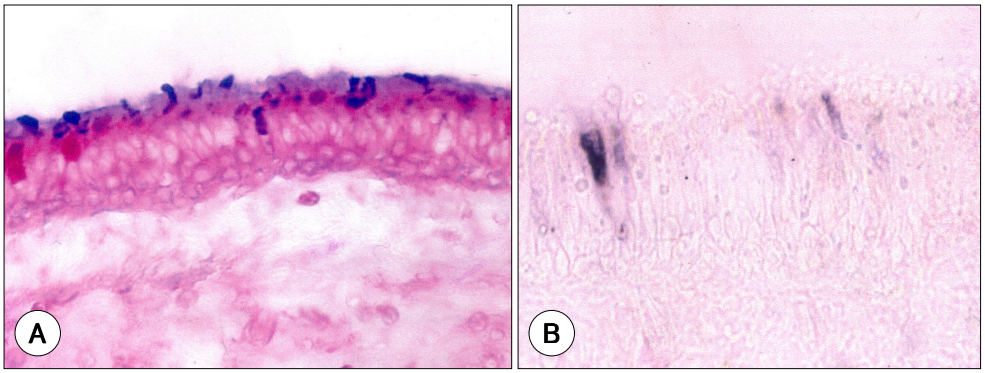

Fig. 3. Alcian blue-periodic acid-Schiff staining (A) and *in situ* hybridization of the MUC5AC mRNA (B) in the normal-appearing mucosa of the posterior ethmoid sinus. MUC5AC mRNA was barely expressed in the goblet cells.

대한 국소화(localization)는 아직 연구에 어려움이 많으며, 대부분의 점액에 대한 국소화 연구는 *in situ* hybridization을 이용하여 하고 있다.

본 연구에서는 MUC5AC mRNA가 배세포에서 모두 또는 일부에서 발현되는지 알기 위해서 연속절편 상에서 AB (pH 2.5) - PAS 염색과 *in situ* hybridization을 시행하였다. 또한 MUC5AC mRNA가 PAS염색에 양성인 배세포에서 발현되는지 혹은 AB염색에 양성인 배세포에서 발현되는지를 함께 조사하였다. 결과에서와 같이, 많은 염증매개물질에 의해 영향을 받고 있는 것으로 볼 수 있는 비용에서는 대부분의 배세포에서 MUC5AC mRNA가 발현되었다. 그러나, 비중격교정술을 받은 환자의 하비갑개 점막에서는 MUC5AC mRNA가 일부의 배세포에서만 발현되었고, 염증성 자극이 거의 없었던 후사골동의 정상 점막에서는 거의 발현되지 않았다. 이러한 결과로 볼 때 MUC5AC mRNA는 사람 코점막 배세포의 일부에서만 발현되는 것을 알 수 있었으며, AB-PAS염색과 MUC5AC mRNA의 발현을 비교해 볼 때, MUC5AC mRNA는 주로 PAS 양성인 배세포에서 발현됨을 알 수 있었다. 즉 MUC5AC 점액은 산성 당단백질보다는 중성 당단백질일 가능성이 높다는 것을 암시한다.

흥미로운 사실은 염증성 자극에 거의 노출이 안 된 것으로 생각할 수 있는후사골동의 정상 점막에서는 MUC5AC mRNA가 거의 발현되지 않는다는 것이다. 이러한 결과는 MUC5AC mRNA가 정상기도점막의 배세포에서도 발현된다는 이전의 보고들과 상반되는 것이다.[6)10)] 현재 상반된 결과가 나타난 이유는 불명확하지만, 환자에서 얻은 조직표본의 상태 차이 때문일 수 있다. 왜냐하면 다른 연구자들은 하비갑개, 기관, 및 기관지 등에서 채취하여 정상이라는 표현을 사

용하였지만 실제로는 진정한 의미의 정상 상태가 아닐 수 있다. 그 조직들은 유해가스, 공기오염물질 그리고 다양한 염증매개물질에 의해 계속해서 자극 받을 수 있는 부위이기 때문이다. 그와는 달리 본 연구에서는 상기한 자극에 의해 직접적으로 영향을 받는 부위가 아닌 후사골동에서 정상으로 보이는 점막만을 사용하였다. 이러한 정상 점막에서는 MUC5AC mRNA가 거의 발현되지 않는 반면, 다양한 염증성 자극에 노출되어 있는 비용에서는 대부분의 배세포에서 MUC5AC mRNA가 발현되었다. 이것은 MUC5AC mRNA가 염증성 자극에 의해 유도될 수 있다는 것을 의미하는데, MUC5AC mRNA가 IL-4,[11] neutrophil elastase,[12] acrolein,[13] endotoxins, 및 IL-9[15] 등의 염증성 매개체에 의해 증가한다는 보고들과 일치하고 있다.

이상의 결과를 종합하면, MUC5AC mRNA는 일반적으로 PAS 양성인 배세포의 일부에서 발현되며, 염증성 자극에 의해 유도된다고 할 수 있다. 향후 후사골동의 정상 점막에서 나타난, PAS 양성이면서 MUC5AC 음성인 배세포에서 발현되는 점액 유전자가 어떤 것인지에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결 론

MUC5AC mRNA는 사람 코점막에서 PAS 양성인 배세포의 일부에서 발현하며, 배세포에 발현하는 것으로 알려져 있는 MUC2와 MUC5AC 외에 다른 점액 유전자도 배세포에 발현될 가능성이 있을 것으로 생각한다.

중심단어 : MUC5AC mRNA · 배세포 · 사람 코점막.

본 논문은 연세대학교 의과대학 2000년도 강사연구비 지원에 의함.

REFERENCES

1) Hovenberg HW, Davies JR, Carlstedt I. *Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: Identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. Biochem J 1996;318:319-24.*
2) Thornton DJ, Howard M, Khan N, Sheehan JK. *Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucus: Evidence for a cysteinerich sequence repeated within the molecule. J Biol Chem 1997;272:9561-6.*
3) Lapensee L, Paquette Y, Bleau G. *Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). Fertil Steril 1997;68:702-8.*
4) Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM. *Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. Cancer Res 1999 Aug 15; 59:4083-89.*
5) Voynow JA, Rose MC. *Quantitation of mucin mRNA in respiratory and intestinal epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1994;11: 742-50.*
6) Buisine MP, Devisme L, Copin MC, Durand-Reville M, Gosselin B, Aubert JP, *et al. Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20:209-18.*
7) Kim SS, Kim KS, Lee JG, Park IY, Koo JS, Yoon JH. *Levels of intracellular protein and messenger RNA of mucin and lysozyme in normal human nasal and polyp epithelium. Laryngoscope 2000; 110:276-80.*
8) Yoon JH, Lee JG, Park IY, Chang MS. *Composition of glycoproteins in goblet cells and submucosal glands. Kor J Otolaryngol 1991;34:732-6.*
9) Lundh B, Brockstedt U, Kristensson K. *Lectin-binding pattern of neuroepithelial and respiratory epithelial cells in the mouse nasal cavity. Histochem J 1989;21:33-43.*
10) Aust MR, Madsen CS, Jennings A, Kasperbauer JL, Gendler SJ. *Mucin mRNA expression in normal and vasomotor inferior turbinates. Am J Rhinol 1997;11:293-302.*
11) Temann UA, Prasad B, Gallup MW, Basbaum C, Ho SB, Flavell RA, *et al. A novel role for murine IL-4 in vivo: Induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion. Am J Respir Cell Mol Biol 1997;16:471-8.*
12) Voynow JA, Young LR, Wang Y, Horger T, Rose MC, Fischer BM. *Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. Am J Physiol 1999;276: L835-L843.*
13) Borchers MT, Wert SE, Leikauf GD. *Acrolein-induced MUC5AC expression in rat airway. Am J Physiol 1998;274:L573-L581.*
14) Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB. *Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. J Biol Chem 1998;273:6812-20.*
15) Longphre M, Li D, Gallup M, Drori E, Ordonez CL, Redman T, *et al. Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. J Clin Invest 1999;104:1375-82.*